

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-542264

(P2002-542264A)

(43) 公表日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 39/02		A 6 1 K 39/02	4 B 0 2 4
9/127		9/127	4 C 0 7 6
9/14		9/14	4 C 0 8 4
35/12		35/12	4 C 0 8 5
35/76		35/76	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-612464(P2000-612464)
 (86) (22) 出願日 平成12年4月21日 (2000. 4. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年10月19日 (2001. 10. 19)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 0 7 6 6
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 6 3 3 8 5
 (87) 国際公開日 平成12年10月26日 (2000. 10. 26)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 3 0 , 2 4 9
 (32) 優先日 平成11年4月21日 (1999. 4. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

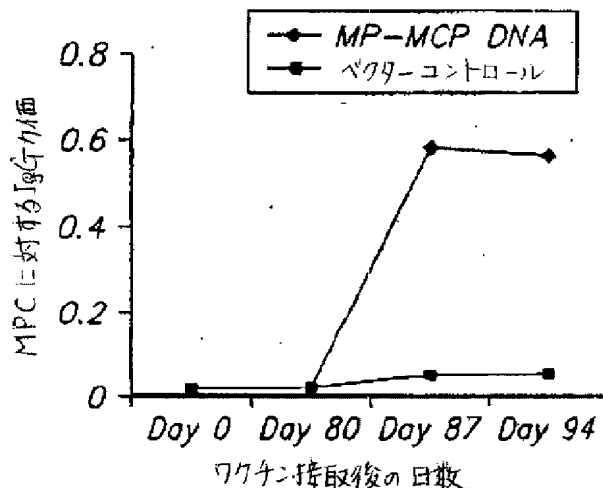
(71) 出願人 パウダージェクト ヴァクシNZ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, スイート シー, サイエンス ドライブ585
 (72) 発明者 シェン, デシャン
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53719, マディソン, スクラントン コート 9
 (72) 発明者 フラー, ジェイムス ティー,
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53575, オレゴン, アッシュ ストリート 415
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸による免疫化

(57) 【要約】

本発明の主な目的は、タンパク質抗原、多糖抗原、または脂質抗原の抗原構造を模倣する新規なペプチドを供給するために、遺伝子ワクチンを用いる従来のワクチンストラテジーの代替を提供することである。組換え核酸分子が記載される。この分子は、標的抗原を模倣するポリペプチドをコードする。第1の配列を有するベクターおよびこれらの分子を含む組成物を含む試薬もまた記載される。これらの試薬を構築するための方法およびこれらの試薬を使用して免疫応答を誘発する方法もまた記載される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験体において、標的抗原を含む因子に対する免疫応答を誘発するためのポリヌクレオチド医薬の製造における、組換え核酸分子の使用であって、該核酸分子は、該標的抗原のペプチド模倣物をコードする第1の核酸配列を含む、使用。

【請求項2】 前記組換え核酸分子が発現ベクターである、請求項1に記載の使用。

【請求項3】 前記組換え核酸分子がプラスミドベクター中に存在する、請求項1または2に記載の使用。

【請求項4】 前記標的抗原が細菌性抗原である、請求項1～3のいずれか1項に記載の使用。

【請求項5】 前記標的抗原が細菌性多糖類である、請求項1～4のいずれか1項に記載の使用。

【請求項6】 前記多糖類が、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*および*Haemophilus influenzae*からなる群より選択される細菌種に由来するかまたはこれらから得られる、請求項5に記載の使用。

【請求項7】 前記細菌性多糖類が、肺炎球菌4型多糖類である、請求項5に記載の使用。

【請求項8】 前記細菌性多糖類が、髄膜炎菌性C群多糖類である、請求項5に記載の使用。

【請求項9】 前記第1の核酸配列が、配列ACARIYYRYDGFAY（配列番号1）を有するペプチド模倣物をコードする、請求項8に記載の使用。

【請求項10】 前記第1の核酸配列が以下の配列
GGCTGCTTGTGCTAGAACTCTATTACAGATATGAT
GGATTTCGCTTACG（配列番号2）
を含む、請求項8に記載の使用。

【請求項11】 前記第1の核酸配列が以下の配列
GGCCCGTAAGCGAATCCATCATATCTGTAATAGAT

TCTAGCACCAAGCA (配列番号3)

を含む、請求項8に記載の使用。

【請求項12】 前記医薬がリポソーム調製物である、請求項1～11のいずれか1項に記載の使用。

【請求項13】 前記医薬が粒子医薬である、請求項1～11のいずれか1項に記載の使用。

【請求項14】 前記粒子医薬が、前記被験体への経皮注入に適切である、請求項13に記載の使用。

【請求項15】 請求項14に記載の使用であって、前記粒子医薬は約0.5～5 μ mのサイズを有するキャリア粒子を含み、かつ該キャリア粒子は、組換え核酸分子で被覆されている、使用。

【請求項16】 前記キャリア粒子が、タングステン、金、白金およびイリジウムの粒子から選択される、請求項15に記載の使用。

【請求項17】 請求項14～16のいずれか1項に記載の使用であって、前記粒子医薬が、無針シリンジにより前記被験体に注入される、使用。

【請求項18】 被験体において、標的抗原を含む因子に対する免疫応答を誘発するためのポリヌクレオチド医薬の製造における、組換え核酸分子の使用であって、前記核酸は、

(a) 該標的抗原のペプチド模倣物をコードする第1の核酸配列、および

(b) ペプチドキャリア分子をコードする第2の核酸配列、

を含み、該第1および第2の核酸配列は、互いに連結され、ハイブリッド配列を形成する、使用。

【請求項19】 前記組換え核酸分子が発現ベクターである、請求項18に記載の使用。

【請求項20】 前記組換え核酸分子がプラスミドベクター中に存在する、請求項18または19に記載の使用。

【請求項21】 前記標的抗原が細菌性抗原である、請求項18～20のいずれか1項に記載の使用。

【請求項22】 前記標的抗原が細菌性多糖類である、請求項18～21の

いずれかに記載の使用。

【請求項23】 前記多糖類が、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*および*Haemophilus influenzae*からなる群より選択される細菌種に由来するかまたはこれらから得られる、請求項22に記載の使用。

【請求項24】 前記細菌性多糖類が、肺炎球菌4型多糖類である、請求項22に記載の使用。

【請求項25】 前記細菌性多糖類が、髄膜炎菌性C群多糖類である、請求項22に記載の使用。

【請求項26】 前記第1の核酸配列が、配列ACARIYYRYDGFA Y（配列番号1）を有するペプチド模倣物をコードする、請求項25に記載の使用。

【請求項27】 前記第1の核酸配列が以下の配列

GGCCTGCTTGTGCTAGAACTCTATTACAGATATGAT
GGATTTCGCTTACG（配列番号2）

を含む、請求項25に記載の使用。

【請求項28】 前記第1の核酸配列が以下の配列

GGCCCGTAAGCGAATCCATCATATCTGTAATAGAT
TCTAGCACAAAGCA（配列番号3）

を含む、請求項25に記載の使用。

【請求項29】 前記医薬がリポソーム調製物である、請求項18～28のいずれか1項に記載の使用。

【請求項30】 前記医薬が粒子医薬である、請求項18～28のいずれか1項に記載の使用。

【請求項31】 前記粒子医薬が、前記被験体への経皮注入に適切である、請求項30に記載の使用。

【請求項32】 請求項31に記載の使用であって、前記粒子医薬は約0.5～5 μ mのサイズを有するキャリア粒子を含み、かつ該キャリア粒子は、組換え核酸分子で被覆されている、使用。

【請求項33】 前記キャリア粒子が、タングステン、金、白金およびイリジウムの粒子から選択される、請求項32に記載の使用。

【請求項34】 前記粒子医薬が、無針シリンジにより前記被験体に注入される、請求項30～33のいずれか1項に記載の使用。

【請求項35】 前記ペプチドキャリア分子がB型肝炎ウイルスに由来するかまたはこれから得られる、請求項18～34のいずれか1項に記載の使用。

【請求項36】 前記ペプチドキャリアがB型肝炎コア抗原である、請求項35に記載の使用。

【請求項37】 前記第1の核酸配列が前記第2の核酸配列中に挿入される、請求項36に記載の使用。

【請求項38】 前記被験体がヒトである、請求項1～37のいずれか1項に記載の使用。

【請求項39】 無針シリンジによる経皮注入に適切な粒子であって、該粒子は、組換え核酸分子で被覆されたキャリア粒子を含み、該組換え核酸分子は、標的抗原のペプチド模倣物をコードする第1の核酸配列を含む、粒子。

【請求項40】 前記組換え核酸分子が発現ベクター中に存在する、請求項39に記載の粒子。

【請求項41】 前記組換え核酸分子がプラスミドベクター中に存在する、請求項39または40に記載の粒子。

【請求項42】 前記標的抗原が細菌性抗原である、請求項39～41のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項43】 前記標的抗原が細菌性多糖類である、請求項39～42のいずれか1項に記載の粒子。

【請求項44】 前記多糖類が、*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*および*Haemophilus influenzae*からなる群より選択される細菌種に由来するかまたはこれらから得られる、請求43に記載の粒子。

【請求項45】 前記細菌性多糖類が、肺炎球菌4型多糖類である、請求項43に記載の粒子。

【請求項46】 前記細菌性多糖類が、髄膜炎菌性C群多糖類である、請求項43に記載の粒子。

【請求項47】 無針シリンジにおける使用に適用される、一回の単位用量または多用量の容器であって、該容器は、請求項39～46のいずれか1項において規定される粒子を含む、容器。

【請求項48】 請求項39～46のいずれか1項において規定される粒子が充填された無針シリンジ。

【請求項49】 標的抗原のペプチド模倣物をコードする第1の核酸配列を含む、組換え核酸分子を含む組成物であって、該組換え核酸分子は、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と組み合わせられる、組成物。

【請求項50】 組換え核酸分子を含む組成物であって、該組換え核酸分子は、

(a) 標的抗原のペプチド模倣物をコードする第1の核酸配列、および

(b) ペプチドキャリア分子をコードする第2の核酸配列、

を含み、該第1および第2の核酸配列は、互いに連結されてハイブリッド配列を形成し、そして薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と組み合わせられる、組成物。

【請求項51】 被験体において免疫応答を誘発する方法であって、該方法は、被験体の細胞を請求項1または18のいずれかに記載の組換え核酸分子でトランスフェクトする工程を包含し、該トランスフェクトする工程は、該被験体内で該ペプチド模倣物を含む分子の発現を可能にする条件下で行われ；かつ該発現は、前記標的抗原に対する免疫応答を誘発するに十分である、方法。

【請求項52】 前記トランスフェクトする工程が、粒子媒介トランスフェクション技術を使用してインビボで行われる、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 請求項51に記載の方法であって、前記トランスフェクトする工程はエキソビボで実施されてトランスフェクトされた細胞を得、該トランスフェクトされた細胞は、前記被験体に実質的に導入される、方法。

【請求項54】 前記被験体がヒトである、請求項51～53のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、分子生物学および免疫学の一般分野に関し、そして、一般に、核酸免疫技術において有用な試薬に関する。より詳細には、本発明は、従来のワクチン成分を模倣する、特に、抗原を模倣する、新規な核酸ワクチン配列、ならびにこのような模倣配列を含む核酸分子、および核酸免疫のためのこのような核酸分子を含む試薬の使用に関する。

【0002】

(背景)

ワクチン接種は、現在、ヒトに対して知られている感染性疾患を制御する、最も対費用効果のある、かつ首尾よい手段である。従来のワクチンストラテジーは、代表的には、感染性因子に由来するワクチン組成物（例えば、インタクトな病原体（例えば、生の弱毒または不活性化病原体）もしくは病原体の一部分（例えば、精製されたサブユニット）を含む組成物）の被験体への接種を包含する。しかしながら、多数の感染性因子については、従来のワクチンストラテジーはまだ、首尾よく開発されなければならず、そして、これらの従来のストラテジーがうまくいかなかった多くの例もまた存在する。これについての1つの理由は、いくつかの病原体が、宿主抗原に対して構造的に類似する表面成分を有し得、従って、ワクチン組成物中で使用された場合に不適切な免疫応答を引き起こし得るからである。従来のワクチン開発において別の周知の問題は、乳児が、その未熟な免疫系のために特定のワクチンに対して応答できないことである。さらに、優勢な表面抗原は、しばしば多価であり得るので、広く有効であるためには、首尾よいワクチン組成物は、多数の価を考慮する必要がある。これらの問題は、多糖ワクチン組成物（例えば、肺炎球菌多糖ワクチンおよび髄膜炎菌性多糖ワクチン、ならびにB型インフルエンザ多糖ワクチン）に関して特に深刻である。

【0003】

Streptococcus pneumoniae は、あらゆる年齢層において罹病率および死亡率の主となる原因である。それは、細菌性肺炎の最も一般

的な1つの原因であり、そしてそれはまた、中耳炎、髄膜炎および敗血症の重要な原因でもある。抗生物質剤および化学療法剤（例えば、スルホンアミド）を用いた初期の成功に関わらず、肺炎球菌〔性〕肺炎は、罹病率および死亡率の重要な原因としてとどまりつづけている。毎年およそ50万人もの症例がある。*Streptococcus pneumoniae*の莢膜血清型多糖を含むワクチン組成物を用いる免疫は、非常に乏しい抗体応答を提供することが観察されている（特に、2歳以下の小児において）。さらに、*Streptococcus pneumoniae*は、なお86の認識された莢膜タイプを有し、この各々がヒトに疾患を引き起こす。この病原に対する完全な多糖ワクチン組成物は、86全ての莢膜タイプを考慮する必要があるが、従って、製造することが不可能である。

【0004】

*Neisseria meningitidis*は、ヒトにおける細菌性髄膜炎および敗血症の原因となる因子であり、そして髄膜炎菌性髄膜炎（これは、流行性で生じる可能性を有する疾患）の原因である。髄膜炎菌は、莢膜抗原および細胞壁抗原の免疫学的特徴に基づいて血清群に分類される。最近認識された血清群には、A、B、C、D、W-135、X、Y、Zおよび29Eが含まれる。髄膜炎菌血清群特異性を担う莢膜多糖抗原は、同定されており、そしてこれらの群（A、B、C、D、W-135およびY血清群を含む）のいくつかから精製されている。

【0005】

これらの髄膜炎菌抗原の同定は、いくつかの商業的な多糖ベースのワクチン（特に、いくつかの髄膜炎菌血清群A、B、C、YおよびW135に対して開発されたワクチン）の開発に至っている。単離された高分子量多糖が、成人において群特異的補体依存性細菌性抗体を誘発し得る、A群およびC群ワクチンにおいて使用されている。しかしながら、これらのワクチンは、若年の小児には有効ではなく、特に2歳以下の小児には有効ではない。実験的B群ワクチン（外膜タンパク質小胞から構成される）は、青年ではおよそ50%の防御であることが見出された。しかし、ワクチン接種した乳児および小児（最も疾患の危険性の高い年齢群である）においては、防御が全く観察されなかった。さらに、これらのワクチ

ンは、血清型および亜型 (s u b t y p e) 特異的であり、そして優勢なB群株は、地理的および時間的変化の両方を受け、このことは、このようなワクチンの有用性を重篤に制限する。

【0006】

Haemophilus influenzae は、ヒトにおける多数の重篤な感染を担う。乳児および若年の小児において、それは、急性細菌性髄膜炎およびいくつかの他の重篤な小児疾患（例えば、関節膿症、蜂巣炎、肺炎、および急性喉頭蓋炎）を引き起こす。成人では、それは、慢性の肺疾患に最もしばしば関連する。*Haemophilus influenzae* の多数の異なる血清型が同定されているが、b型が、ヒトの罹病率の最も一般的な原因である。*H. influenzae* (b型) に対する多糖ワクチンは、幾分か、成人において有効であるが、しかしながら、これらのワクチンは、免疫した2歳以下の小児においては非常に乏しい抗体応答を提供する。なぜなら、それらがT依存性抗原であるからである。

【0007】

他の多糖抗原でも同様に、*H. influenzae* 多糖は、タンパク質キャリアへの結合体化によってT依存性抗原に変換され得る。このような多糖-タンパク質結合体は、小児において免疫原性であり、そしてブースト可能なIgG応答を惹起し得る。*H. influenzae* (b型) に対する多糖結合ワクチンは、米国において過去10年間にわたって、この疾患を制御するために非常に有効であった。しかしながら、結合ワクチンを開発および製造することは、非常に高価でかつ複雑なプロセスであり、これらのワクチン組成物において法外に高い費用に達する。

【0008】

(発明の要旨)

本発明の主な目的は、タンパク質抗原、多糖抗原、または脂質抗原の抗原構造を模倣する新規なペプチドを供給するために、遺伝子ワクチンを用いる従来のワクチンストラテジーの代替を提供することである。より詳細には、病原由来の1つ以上の免疫原性エピトープを模倣するペプチドをコードする新規な核酸配列が

、提供される。コードされたペプチド分子は、元の（例えば、ネイティブな）免疫原とは異なる化学組成を有する。これらの核酸配列は、種々の異なるアプローチを用いて（最も代表的には、抗原特異的抗体分子を用いてパンニングされるランダムペプチドディスプレイライブラリーを用いて）同定され得る。一旦同定され、合成されると、これらの核酸分子は、適切な分子（例えば、プラスミドベクター）中に容易に挿入され得、そして選択された抗原に対する免疫応答を提供するために核酸免疫レジメにおいて使用され得る。

【0009】

生物学的系において、ペプチドは、多糖特異的抗体に、ならびに他の多糖結合タンパク質に結合することにより、多糖分子を模倣し得る。この模倣は、当該分野において利用されており、そしてコンカナバリンAのような分子（末端 α 結合マンノース残基またはグルコース残基を有するオリゴ糖に結合する）が、p I I Iコートタンパク質のアミノ末端に短いペプチド配列を有する細菌ファージライブラリーからペプチド模倣物を選択するために使用されている。Oldenbergerら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393; Scottら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5398。同様に、モノクローナル抗体は、再度、ファージライブラリーを用いて腺癌細胞の表面に存在する炭水化物のペプチド模倣物を同定するために使用されている。Hoessら（1993）Gene 128:43。

【0010】

ペプチドはまた、多糖特異的抗体を惹起するために使用されている。例えば、Westeringら（1988）Infect. Immun. 56:1120は、抗イデオタイプ抗体を惹起するために、N. meningitidis（C血清群）莢膜多糖に対するモノクローナル抗体を使用した。この抗体で受動免疫したマウスは、髄膜炎菌細菌の致死用量での感染に対して防御された。抗イデオタイプ抗体分子由来のペプチドフラグメントが、菌血および髄膜炎菌C群細菌での致死チャレンジ後の死亡から動物を防御する血清抗体を惹起することが、続いて見出された。Westeringら（1995）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4021。

【0011】

これらおよび他の試みは、いくつかのペプチド模倣物、すなわち、種々の細菌多糖およびさらにはタンパク質抗原を模倣するペプチドの同定に至った。しかし、これらのペプチドは、免疫原性自体は低く、そしてワクチン組成物として使用される場合、キャリアタンパク質に化学的に結合体化される。本発明は、特定のペプチド模倣物（例えば、多糖抗原を模倣するペプチド）をコードする核酸配列の発見、および遺伝子ワクチン組成物におけるこのような核酸配列の使用に基づく。

【0012】

従って、本発明の1つの局面では、目的のペプチド模倣物をコードする核酸配列を含む組換え核酸分子が提供され、ここでこの核酸配列は、1つ以上の制御配列に作動可能に連結されている。1つの特定の実施形態では、この核酸分子は、ベクター構築物（例えば、プラスミドベクターまたは組換えウイルスベクター）中に存在する。別の特定の実施形態では、このペプチド模倣物は、以下からなる群から選択される細菌種に由来する、またはそれから得られる多糖抗原に対応する：*Neisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*、および*Haemophilus influenzae*。

【0013】

本発明の別の局面では、目的のペプチド模倣物をコードする第一の核酸配列およびペプチドキャリア分子をコードする第二のヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子が提供され、ここでこの第一の配列および第二の配列は共に連結されてハイブリッド配列を形成する。1つの特定の実施形態では、ペプチドキャリア分子は、B型肝炎ウイルスコア抗原である。

【0014】

本発明の関連した局面では、本発明の組換え核酸分子は、被験体において、ペプチド模倣物に対応する抗原を含む薬剤に対する免疫応答を惹起するための、ポリヌクレオチド医薬の製造において使用される。このポリヌクレオチド医薬は、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と組み合わせた、本発明の組換え核酸

分子を含む組成物の形態であり得る。特定の局面では、このポリヌクレオチド医薬は、リポソーム調製物である。他の局面では、ポリヌクレオチド医薬は、粒子医薬である。この粒子医薬は、処置されるべき被験体への経皮注射に適切であることが好ましい。

【0015】

本発明の主な目的はまた、無針シリンジによる経皮注射に適切な粒子を提供することである。ここで、この粒子は、本発明による組換え核酸分子で被覆されたキャリアを含む。

【0016】

本発明のさらなる主要な目的は、標的抗原のペプチド模倣物をコードする核酸分子を使用して、免疫された被験体におけるその標的抗原に対する免疫応答を誘発するための方法を提供することである。この方法は、その被験体の細胞をそのペプチド模倣物をコードする組換え核酸分子でトランスフェクトする1以上の工程を包含する、一次免疫工程を伴う。本発明の組換え核酸分子のいずれか1つを含む発現カセットおよび／またはベクターを使用して、細胞をトランスフェクトし得、そしてトランスフェクションは、その被験体内でのペプチド模倣物の発現を可能にする条件下で行われる。この方法はさらに、その被験体に二次組成物を投与する1以上の工程を包含する、二次（すなわち、ブースター）免疫工程を伴い得る。ここで、この二次組成物は、同じペプチド模倣物および／または標的抗原を含有する。これらの免疫方法は、その標的抗原に対する免疫応答を誘発するのに十分である。

【0017】

一次免疫工程の間に行われるトランスフェクト手段は、インビボまたはエキソビボ（例えば、トランスフェクト細胞を得て、引き続いて、この細胞を被験体に導入し、その後、二次免疫工程を行うため）のいずれかで行われ得る。インビボトランスフェクションが使用される場合、核酸分子は、プラスミドDNAの筋内注射または皮内注射によって被験体に投与され得るか、または好ましくは、粒子媒介送達技術を使用して被験体に投与され得る。

【0018】

本発明の利点は、これらの組換え核酸分子を、核酸免疫ストラテジーにおける試薬として使用し、特定の抗原（特に、ポリサッカリド抗原）に対する優れた免疫応答を、定性的かつ定量的に達成し得ることである。標的抗原のペプチド模倣物をコードする核酸ワクチン組成物を使用して、全ての年齢の被験体（特に、従来のワクチン組成物（例えば、ポリサッカリドベースの組成物）に対して、代表的に応答性でない、低年齢の幼児）をワクチン接種し得ることも、利点である。このペプチド模倣物は、それらの対応する標的抗原とは化学的に異なるので、これらは、免疫された被験体における不適切な免疫応答（抗原の天然形態またはネイティブ形態が自己応答性の抗体産生を生じ得る、被験体の状態のような）を回避し得る。本発明のなおさらなる利点は、DNAベースのペプチド模倣物ワクチンが、単純かつ正確に生産可能であること、および複数のペプチド模倣物をコードする配列が、単一の分子で提供されることである。これらのペプチド模倣物核酸ワクチン組成物はまた、T非依存性ポリサッカリドをT依存性ペプチド抗原に変えて、従って、記憶免疫を有する長期のIgG応答を誘発し得る。

【0019】

本発明のこれらのおよび他の目的、局面、実施形態および利点は、本明細書中の開示を考慮して、当業者に容易に想到される。

【0020】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明を詳細に記載する前に、本発明が、特定に例示された分子またはプロセスパラメーターに限定されず、これらが、もちろん変化し得ることが理解されるべきである。また、本明細書中で使用される技術は、本発明の特定の実施形態を記載する目的のためのみのものであり、限定することが意図されないことも理解されるべきである。さらに、本発明の実施は、他に示されない限り、ウイルス学、微生物学、分子生物学、組換えDNA技術および免疫学の従来の方法を使用し、これらの方法は全て、当業者の範囲内にある。このような技術は、文献に十分説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、1989）；DNA Cloning: A Practical Approach, 第I&II

卷 (D. Glover 編) ; Oligonucleotide Synthesis (N. Gait 編、1984) ; A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) ; および Fundamental Virology、第2版、第I & II 卷 (B. N. Fields および D. M. Knipe 編) を参照のこと。

【0021】

本明細書中で引用される (前述および後述に関わらず) 、全ての刊行物、特許および特許出願は、その全体が参考として本明細書によって援用される。

【0022】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形態「a」、「an」および「the」は、その内容が他に明確に示されない限り、複数の言及を含むことに留意されたい。

【0023】

(A. 定義)

他に定義しない限り、本明細書において使用されるすべての技術および科学的用語は、本発明が関連する当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものと類似または等価な多数の方法および材料が本発明の実施において使用され得るが、好ましい材料および方法が本明細書において記載される。

【0024】

本発明を記載するにおいて、以下の用語を使用し、そして以下に記載されるように定義されることを意図する。

【0025】

用語「核酸免疫化」とは、本明細書において使用されて抗原 (単数または複数) のインビボ発現のために宿主細胞へと1つ以上の選択された抗原をコードする核酸を導入することをいう。本発明において、その核酸分子は、目的の抗原に対応するものに対応する1つ以上のペプチド模倣物をコードする。その核酸は、例えば、標準的な筋肉内または皮内の注射；経皮粒子送達；吸入；局所的または経皮、経鼻もしくは粘膜態様の投与によってレシピエント被験体に直接導入され得

る。その分子は、あるいは、エキソビボで被験体から取り出された細胞に導入され得る。この後者の場合、その細胞は、その被験体に再導入され、そこで、免疫応答がその核酸分子によってコードされるペプチド模倣物に対応する抗原に対して惹起され得る。

【0026】

「無針シリンジ」とは、皮膚を穿孔するために従来の針の助けなしに経費的に粒子組成物を送達する装置を意味する。本発明を用いた使用のための無針シリンジは、本明細書のいたるところで考察される。

【0027】

用語「経皮」送達とは、皮内（例えば、真皮または上皮中へ）、経皮（transdermal）（例えば、「経皮（percutaneous）」および経粘膜の投与（すなわち、皮膚または粘膜組織中へのもしくはそれを通る薬剤の通過による送達）を意図する。例えば、以下を参照のこと：Transdermal Drug Delivery : Developmental Issues and Research Initiatives, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); Controlled Drug Delivery : Fundamentals and Applications, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); および Transdermal Delivery of Drugs, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987)。従って、この用語は、米国特許第5,630,796号に記載されるような無針シリンジ送達、および米国特許第5,865,796号において記載されるような粒子媒介される送達からの送達を包含する。

【0028】

用語「キャリア分子」および「ペプチドキャリア分子」とは、本明細書において通常の意味で使用されて、ペプチド配列、代表的には高分子を指す。その高分子に対して、低分子（例えば、ハプテン（例えば、ペプチド模倣物））がその低分子の免疫原性を増強するために付着され得る。

【0029】

「コアキャリア」とは、ゲスト核酸（例えば、DNA）が規定された粒子サイズを付与し、そして十分に高い密度を提供して細胞膜貫通に必要なモーメントを達成し、その結果、そのゲスト分子が粒子媒介技術（例えば、米国特許第5, 100, 792号）を用いて送達され得るようにコーティングされるキャリアを意味する。コアキャリアは、代表的には、タングステン、金、白金、フェライト、ポリスチレン、およびラテックスのような材料を含む。例えば、以下を参照のこと：Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, New York, NY 10-11頁。

【0030】

「抗原」とは、個体における免疫学的反応を惹起し得る、任意の因子（一般に、高分子）をいう。この用語は、個々の高分子または抗原性高分子の均一または不均一の集団をいうために用いられ得る。本明細書において使用される場合「抗原」とは、一般に、1つ以上のエピトープを含む標的分子またはその一部をいう。ここで、その抗原に対応するものペプチドが入手され得る。本発明の目的のために、抗原は、任意の公知の標的ウイルス、細菌、寄生生物または真菌の病原体に由来し得る。この用語はまた、種々の腫瘍特異的な任意の抗原を意図する。さらに、本発明の目的のために、「抗原」とは、そのタンパク質（および従ってそのペプチド模倣物）が十分な免疫原性を維持する限り、改変（例えば、欠失、付加および置換（一般に性質が保存的である）改変を有するタンパク質を含む。これらの改変は、意図的であり得（例えば、部位指向性変異誘発による）、またはその抗原を生成する宿主の変異によるように偶然であり得る。

【0031】

「標的抗原を模倣する」ペプチド（ときに、ペプチド模倣物といわれる）は、その標的抗原とは異なる化学組成を有するペプチド配列であるが、なおも、その標的抗原について特異的な抗体分子と少なくとも交叉反応し得、そしてそのようなペプチド配列が被験体において発現される場合、その標的抗原に対して免疫応

答を誘発し得る。そのようなペプチドは、タンパク質（ペプチド）抗原、ポリサッカリド抗原、または脂質抗原を模倣し得る。本発明の下で、ペプチドは、標的タンパク質またはペプチド抗原を模倣する場合、それは、その標的タンパク質またはペプチド抗原とは、異なる化学構造、すなわち、異なるアミノ酸配列を有する。

【0032】

本発明の種々の局面において、そのペプチドは、1つ以上のT細胞エピトープを含む抗原に対応する。「T細胞エピトープ」とは、概して、T細胞応答を誘導し得るペプチド構造の特徴をいう。この点に関し、当該分野において、T細胞エピトープは、MHC分子のペプチド結合開裂内の拡張されたコンフォメーションを仮定する線形のペプチド決定因子を含むことが受容され得る（Unanue et al. (1987) Science 236:551-557）。本明細書において使用される場合、T細胞エピトープは、概して、少なくとも約3～5アミノ酸残基を有するペプチドであり、そして好ましくは、少なくとも5～10またはそれを超えるアミノ酸残基を有するペプチドである。特定の抗原およびそのペプチド模倣物が細胞媒介性免疫原性応答を刺激する能力は、多数の周知のアッセイ（例えば、リンパ増殖（リンパ球活性化）アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイ、または感作された被験体におけるその抗原について特異的なTリンパ球についてのアッセイを行うことによる）によって決定され得る。例えば、以下を参照のこと：Erickson et al. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199；およびDoe et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376。

【0033】

本発明の他の局面において、ペプチド模倣物は、1つ以上のB細胞エピトープを含む抗原に対応する。「B細胞エピトープ」とは、一般に、特定の抗体分子が結合する抗原上の部位をいう。抗体応答を惹起し得るエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を用いて容易に行われ得る。例えば、Geysenら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002（ペプチドを迅速に合成して、所定の抗原における免疫原性エピトープの位置

を決定する一般的方法)；米国特許第4,708,871号(抗原のエピトープを同定し、そして化学合成するための手順)；およびGeysenら(1986) *Molecular Immunology* 23:709-715(所定の抗体に対して高親和性を有するペプチドを同定するための技術)を参照のこと。

【0034】

目的の抗原に対する「免疫応答」は、抗原に対応するペプチド模倣物に対する体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答の個体における発生である。本発明の目的に関して、「体液性免疫応答」とは、抗体分子により媒介される免疫応答をいい、一方「細胞性免疫応答」とは、Tリンパ球および／または他の白血球により媒介される免疫応答をいう。

【0035】

ポリヌクレオチドは、代表的には、以下の4つのヌクレオチド塩基の特定の配列から構成される：アデニン(A)；シトシン(C)；グアニン(G)；およびチミン(T)（ポリヌクレオチドがRNAである場合に、ウラシル(U)がチミンの代わりになる）；。従って、用語、核酸配列は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータにおけるデータベースに入力され得、そして機能的ゲノムおよび相同性検索のような生物情報科学(bioinformatics)適用のために使用され得る。

【0036】

「ベクター」は、核酸分子を標的細胞に移入し得る（例えば、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、粒子状キャリア、およびリポソーム）。代表的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を指向し得、そして標的細胞に遺伝子配列を移入し得る任意の核酸構築物を意味する。従って、この用語は、クローニングベヒクルおよび発現ベヒクル、ならびにウイルスベクターを含む。「プラスミド」は、染色体外遺伝エレメントの形態にあるベクターである。

【0037】

選択された抗原のペプチド模倣物を「コードする」核酸配列は、適切な調節配

列の制御下に配置された場合、転写され（DNAの場合）、そしてインビボでポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンにより決定される。本発明の目的のために、このような核酸配列としては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：ウイルス、原核生物または真核生物のmRNA由来のcDNA、ウイルスまたは原核生物のDNAまたはRNA由来のゲノム配列、および合成DNA配列でさえも。転写終止配列は、コード配列に対して3'側に位置し得る。

【0038】

「プロモーター」は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの転写を開始し、そして調節するヌクレオチド配列である、プロモーターとしては、誘導性プロモーター（プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現が、分析物、補因子、調節タンパク質などにより誘導される場合）、抑制性プロモーター（プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現が、分析物、補因子、調節タンパク質などにより抑制される場合）および構成性プロモーターが挙げられ得る。用語「プロモーター」または「制御エレメント」は、全長プロモーター領域およびこれらの領域の機能的（例えば得、転写または翻訳を制御する）セグメントを含む。

【0039】

「作動可能に連結される」とは、そのように記載された成分が、それらの有用な機能を奏するように構成されるエレメントの配置をいう。従って、核酸配列に作動可能に連結した所定のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合にその配列の発現をもたらし得る。プロモーターは、配列の発現を方向付けるように機能する限り、その配列と連続している必要はない。従って、例えば、転写されたが、未だ翻訳されていない配列の介入は、プロモーター配列と核酸配列との間に存在し得、そしてなおこの核酸配列およびプロモーター配列は、コード配列に「作動可能に連結され」ていると考えられ得る。

【0040】

「組換え（体）」は、ポリヌクレオチドの全てまたは一部と関連づけられない

起源または操作により、ゲノム、cDNA、半合成、または合成起源の核酸分子（ポリヌクレオチド）を記載するために用いられる。このポリヌクレオチドとは、天然に関連づけられているか、そして／または天然に連結したポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結されている。単一組換え核酸分子内に含まれる2つの核酸配列は、それらが通常は、天然に互いに関連づけられない場合、互いに対して「異種」である。

【0041】

核酸およびアミノ酸の「配列同一性」または「配列相同性」を決定するための技術はまた、当該分野において公知である。代表的に、そのような技術は、遺伝子についてのmRNAのヌクレオチド配列を決定する工程および／またはそれによりコードされるアミノ酸配列を決定する工程、ならびに第2のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列とこれらの配列を比較する工程を包含する。一般的に、「同一性」とは、それぞれ、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の正確な一致をいう。2つ以上の配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）が、それらの「パーセント同一性」を決定することによって比較され得る。2つの配列のパーセント同一性は、核酸配列またはアミノ酸配列のいずれにおいても、整列された2つの配列の間の正確に一致する数を、より短い方の配列の長さにより除算し、そして100を乗算したものである。核酸配列に対する近似のアラインメントが、SmithおよびWaterman、Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)の局所的相同性アルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff、Atlas of Protein Sequence and Structure, M. O. Dayhoff編、5補遺、3:353-358、National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C., USAによって開発された得点マトリックスを使用することによってアミノ酸配列に対して適用され得、そしてGribnikov, Nucl. Acids Res. 14 (6):6745-6763 (1986)によって規格化され得る。配列のパーセント同一性を決定するためのこのアルゴリズムの例示

的実行が、「ベストフィット (Best Fit)」ユーティリティーアプリケーションにおける Genetics Computer Group (Madison, WI) によって提供される。この方法についてのデフォルトパラメータは、Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual、Version 8 (1995) (Genetics Computer Group, Madison, WI から入手可能) 中に記載される。本発明の文脈においてパーセント同一性を確立する好ましい方法は、University of Edinburgh によって著作権が所有されて、John F. Collins および Shane S. Sturrock によって開発されて、そして IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA) によって配給される MPSRCH パッケージのプログラムを使用することである。デフォルトパラメータが得点表について使用される場合、このスイート (suite) のパッケージから、Smith-Waterman アルゴリズムが使用され得る (例えば、12 のギャップオープンペナルティー、1 のギャップイクステンションペナルティーおよび 6 のギャップ)。そのデータから、生成された「一致」値は、「配列同一性」を示す。配列間のパーセント同一性または類似性を計算するための適切な他のプログラムは、一般的に当該分野において公知であり、例えば、別のアラインメントプログラムは BLAST であり、デフォルトパラメータと共に使用される。例えば、BLAST N および BLAST P は、以下のデフォルトパラメータを使用して使用され得る：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；予期 (expect)＝10；マトリックス＝BLOSUM62；説明＝50 配列；分類 (sort by)＝高得点 (HIGH SCORE)；データベース＝非重複性、GenBank および EMBL および DDBJ および PDB および GenBank CDS 翻訳 および Swissタンパク質 および Spupdate および PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレス：<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST> において見出され得る。

あるいは、相同性は、相同な領域間の安定な二本鎖を形成する条件下で、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって決定され得、次いで一本鎖特異的ヌクレアーゼを用いて消化し、そして消化されたフラグメントのサイズを決定する。上記の方法を使用して決定される場合、2つのDNA配列または2つのポリペプチド配列は、その分子の定義された長さに渡って、その配列が少なくとも約80%～85%配列同一性、好ましくは少なくとも約90%配列同一性および最も好ましくは少なくとも約95%～98%配列同一性を示す場合、互いに「実質的に相同」である。本明細書中で使用される場合、また、実質的に相同であるとは、特定したDNA配列またはポリペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列をいう。実質的に相同であるDNA配列は、例えば、その特別な系について定義されるようなストリンジェントな条件下におけるサザンハイブリダイゼーション実験において同定され得る。例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSC、0.1%SDSおよび100 μ g/mlの変性サケ精子DNAを含み得、そして洗浄条件は、37℃にて2×SSC、0.1%SDS、次いで68℃にて1×SSC、0.1%SDSを含み得る。適切なハイブリダイゼーション条件を定義することは、当業者の範囲内である。例えば、Sambrookら、前出；DNA Cloning、前出；Nucleic Acid Hybridization、前出を参照のこと。

【0043】

用語「アジュバント」は、抗原特異的免疫応答を特異的にか、または非特異的に変更し得るか、増大し得るか、指向し得るか、再指向（redirecting）し得るか、増強し得るか、または開始させ得る任意の物質または組成物を意図する。従って、抗原を伴うアジュバントの同時投与は、その抗原が投与される被験体における所望の免疫応答を達成するために必要な抗原のより低い用量またはより少ない用量を生じ得るか、あるいは同時投与は、被験体における質的および／または量的に異なる免疫応答を生じ得る。アジュバントの有効性は、ワクチン組成物と共にアジュバントを動物に投与し、並行してワクチン組成物単独で動物に投与し、そしてこの2つの群における抗体および／または細胞媒介性免疫を

、標準的なアッセイ（例えば、放射免疫アッセイ、E L I S A、C T L アッセイなど（全ては、当該分野において周知である））を使用して比較することによって決定され得る。代表的に、ワクチン組成物において、このアジュバントは、抗原由来の別個の部分であるが、単一分子は、アジュバント特性および抗原特性（例えば、コレラ毒素）の両方を有し得る。

【0044】

用語「個体」および「被験体」は、ヒトおよび他の霊長類を含むが限定されず、非ヒト霊長類（例えば、チンパンジーおよび他のサル（a p e）ならびにサル（m o n k e y）種；家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ）；家庭内動物（例えば、イヌおよびネコ）；げっし類を含む実験動物（例えば、マウス、ラットおよびモルモット）；家庭内、野生および狩猟用のトリを含むトリ（例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよび他の家禽のトリ（アヒル、ガチョウなど）））を含む亜門コルダータ（c o r d a t a）の任意のメンバーを言及するために本明細書中で交換可能に使用される。この用語は、特定の年齢を意味しない。従って、成体および新生の個体の両方が包含されることが意図される。本明細書中に記載される方法は、上記の任意の脊椎動物種における使用のために意図される。なぜなら、これらの全ての脊椎動物の免疫系は同じように作用するからである。

【0045】

（B．一般方法）

1つの実施形態において、組換え核酸分子が提供される。組換え分子は、標的抗原を模倣するペプチドをコードする配列を含む。この標的抗原は、任意の適切な抗原であり得、そして好ましくは、病原体（例えば、ウイルス病原体、細菌病原体もしくは寄生病原体）と関連するか、またはこの抗原は腫瘍特異的抗原であり得る。特定の実施形態では、配列は、多糖類抗原（例えば、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s、S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a eまたは H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a細菌種から誘導されるかまたはこれらから得られる多糖類）を模倣するペプチドをコードする。

【0046】

特定のペプチド模倣物は、当業者に公知の技術を使用して同定される。例えば、可溶性ペプチド、固相上につながれたペプチド、細菌ファージ表面タンパク質においてディスプレイされたペプチド、細菌表面タンパク質または抗体は全て、適切なペプチド模倣物についてのスクリーニングに使用され得る。直線ペプチドエピトープを同定するための1つの好ましい方法は、無作為のペプチドまたはタンパク質バクテリオファージライブラリーの構築およびスクリーニングを必要とする。このようなファージディスプレイ技術を使用してバクテリオファージの表面上の所定のタンパク質またはペプチドの数百万の変異体をディスプレイし得、これは、所定の標的抗原に関する高反応性分子を発見するための高性能スクリーニングを可能にする。これらのライブラリーは、当該分野で公知の従来手順を使用して構築され得る。例えば、適切な手順は、米国特許第5,223,409号、および同第5,403,484号、ならびにDevlinら(1990) Science 249:404-406; Kayら(1993) Gene 128:59-65; Smithら(1993) Gene 128:37-42; Hoessら(1993) Gene 128:43-49; およびSastriら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-5732 (これらの特許および刊行物の全ては、本明細書中で参考として援用される)に記載される。

【0047】

従って、これらのいずれかまたは同等の手順を使用して、標的抗原に関するペプチド模倣物についてのスクリーニングのためのファージディスプレイライブラリーを作製し得る。適切な標的ウイルス抗原としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ウイルスの肝炎ファミリー（A型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、デルタ型肝炎（HDV）、E型肝炎ウイルス（HEV）およびG型肝炎ウイルス（HGV）を含む）由来の抗原をコードするポリヌクレオチド配列；単純疱疹ウイルス（HSV）1型および2（例えば、HSV-1およびHSV-2糖タンパク質、gB、gDおよびgH）型由来の抗原；水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタインバーウイルス（EBV）およびサイトメガロウイルス（CMV）（CMV gB

およびgHを含む)由来の抗原;ならびに他のヒトヘルペスウイルス(例えば、HHV6およびHHV7)由来の抗原(例えば、Cheeら(1990) *Cytomegaloviruses* (J. K. McDougall編、Springer-Verlag, 125-169頁;McGeochら(1988) *J. Gen. Virol.* 69:1531-1574;米国特許第5,171,568号;Baerら(1984) *Nature* 310:207-211;およびDavisonら(1986) *J. Gen. Virol.* 67:1759-1816を参照のこと)。

【0048】

種々のHIVの遺伝子サブタイプのメンバーを含むHIV抗原(例えば、多くのHIV-1およびHIV-2単離物に関するgp120配列)は、公知であり、そして報告されている(例えば、Myersら, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992);およびModrowら(1987) *J. Virol.* 61:570-578を参照のこと)。そして、これらの単離物のいずれかに由来する抗原は、本方法において用途を見出す。さらに、本発明は、種々のHIV単離物のいずれかに由来する他の免疫原性分子に同等に適用可能である。これらの単離物は、種々の外被タンパク質(例えば、gp160およびgp41、gag抗原(例えば、p24gagおよびp55gag)ならびにHIVのpol、env、tat、vif、rev、nef、vpr、vpuおよびLTR領域に由来するタンパク質))のいずれかを含む。他のウイルスに由来するかまたはこれらから得られる抗原(例えば、限定を伴わない、以下のファミリーのメンバー由来の抗原(*Picornaviridae* (例えば、ポリオウイルスなど);*Caliciviridae*; *Togaviridae* (例えば、風疹ウイルス、デング熱ウイルスなど);*Flaviviridae*; *Coronaviridae*; *Reoviridae*; *Birnaviridae*; *Rhabdoviridae* (例えば、狂犬病ウイルスなど); *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (例えば、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルスなど); *Bun*

yaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (例えば、HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (HTLV-III, LAV, ARV, hTLRなどとしても公知である)) (とりわけ、HIV_{IIb}、HIV_{SF2}、HIV_{LAV}、HIV_{LAI}、HIV_{MN}; HIV-1_{CM235}、HIV-1_{USA}; HIV-2の単離物由来の抗原が挙げられるがこれらに限定されない))は、ディスプレイライブラリーを構築するために使用され得る。これらのウイルスおよび他のウイルスの記載については、例えば、Virology第3版(W. K. Joklik編、1988); Fundamental Virology, 第2版(B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編、1991)を参照のこと。

【0049】

適切な細菌抗原および寄生抗原をコードする配列は、疾患(例えば、ジフテリア、百日咳、破傷風、結核、細菌性肺炎または真菌性肺炎、コレラ、腸チフス、悪疫、細菌性赤痢またはサルモネラ症、在郷軍人病(Legionaire's Disease)、ライム病、らい病、マラリア、鉤虫、オンコセルカ症、住血吸虫症、トリパノソーマ症(Trypanosomiasis)、レスマニア症(Lesmaniasis)、ジアルジア鞭毛虫症(Giardia)、アメーバ症(Amoebiasis)、フィラリア症、ボレリア症(Borelia)および旋毛虫症)に応答可能な公知の作因から得られるかまたはそれに由来する。なおさらなる抗原は、以下の作因のような非従来の要因から得られるかまたはそれらに由来する:例えば、クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、スクラピー、ミンクの伝染性脳症および慢性ろいそう疾患の作因、またはウシの海綿状脳症に関連するプリオンのようなタンパク質様感染粒子。

【0050】

一旦、ライブラリーが構築されると、このライブラリーは、標的抗原に対するモノクローナル抗体でスクリーニングされる。スクリーニング抗体と結合するバクテリオファージのプラークが選択され、(標準のクローニング技術を使用して)クローニングされ、そして増殖され、次いで標準の競合結合アッセイ形式で、標的抗原への抗体の結合を阻害する能力について試験される。抗体の結合を阻害

するペプチドをディスプレイするバクテリオファージが配列決定され、クローン化されたペプチド模倣物の核酸配列およびアミノ酸配列が決定される。次いで、この核酸配列は合成され、そしてコードされるペプチドが標的抗原に対する抗体を産生するか否かを決定するための試薬として使用され、そしてさらに核酸配列で免疫化された宿主において標的抗原に対する十分な免疫応答を誘発し得る。

【0051】

同様のファージライブラリー手順はまた、標的抗原の構造エピトープを模倣するペプチドを同定するために使用され得る。例えば、マウスは、標的抗原に対して特異的なモノクローナル抗体で免疫化され得る。マウス由来の脾細胞は、免疫応答に十分な時間が経過した後に回収される。マウスIgG（回収された脾細胞から得られる）の重鎖および軽鎖の可変領域に関するmRNAは抽出され、そしてcDNAライブラリーが構築される。次いで、このcDNAは、例えば、Hulseら（1989）Science 246:1275-1281（これは、本明細書中で参考として援用される）の方法を使用して、市販のコンビナトリアルバクテリオファージライブラリーへクローン化され得る。

【0052】

次いで、これらのコンビナトリアルライブラリーは、上記のようにモノクローナル抗体を使用してスクリーニングされ、そして陽性のプラークを標準の技術に従って選択しそしてクローニングした。このクローニングされたバクテリオファージを増殖し、そして標的抗原と結合するモノクローナル抗体を阻害する能力についてスクリーニングした。抗体の結合を阻害するこれらのバクテリオファージは、免疫化された動物において抗標的抗原抗体の産生を誘発する能力についてさらにスクリーニングされ、そして選択された候補物は、重鎖および軽鎖の可変領域（例えば、抗原結合部位）の配列を決定するために配列決定され、そして標的抗原の構造エピトープに対応するペプチド模倣物を生成することに対して推定がなされた。

【0053】

次いで、ペプチド模倣物をコードする核酸配列は、1つ以上の適切なコントロール配列と対にされ、本発明の組換え核酸分子を提供する。例えば、クローニン

グ技術およびDNAを得てそして単離するために使用される技術の記載については、Sambrookら（前出）を参照のこと。ポリヌクレオチド配列はまた、クローニングではなく、合成的に作製され得る。

【0054】

一旦、ペプチド模倣物に関連する配列および関連するコントロール配列を得ると、これらは、動作可能に連結されて、標準のクローン化技術または分子生物学的技術を使用して組換え核酸分子を提供し得る。例えば、Edge（1981）Nature 292:756；Nambairら（1984）Science 223:1299；およびJayら（1984）J. Biol. Chem. 259:6311を参照のこと。次いで、この核酸分子は、発現プラスミドベクター構築物または発現ウイルスベクター構築物のような適切なベクター中へ挿入され得る。

【0055】

より典型的には、一旦、ペプチド模倣物をコードする配列が同定されそして適切に合成されると、これは、挿入された配列と動作可能に連結されるコントロール配列を既に含むベクター中に挿入され得る。従って、標的被験体においてインビボでのペプチド模倣物の発現を可能にする。例えば、哺乳動物細胞発現についての典型的なプロモーターとしては、SV40初期プロモーター、CMVプロモーター（例えば、CMV最初期プロモーター）、マウス乳腫瘍ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（major late promoter）（Ad MLP）および他の適切で効率的なプロモーターシステムが挙げられる。非ウイルスプロモーター（例えば、マウスメタロチオネイン遺伝子由来のプロモーター）はまた、哺乳動物発現に使用され得る。好ましくは、コード配列に対して5'に位置する、翻訳の開始を最適化するための配列もまた存在する。転写終結シグナル／ポリアダニル化シグナルの例としては、Sambrookら（前出）に記載されるようなSV40由来のシグナル、ならびにウシ成長ホルモントーミネーター配列由来のシグナルが挙げられる。スプライシングドナーおよびアクセプター部位を含むイントロンはまた、発現カセット中に設計され得る。

【0056】

さらに、エンハンサー因子は、発現レベルを増加するために、発現カセット中に含まれ得る。適切なエンハンサーの例としては、SV40初期遺伝子エンハンサー（Dijkemaら（1985）EMBO J. 4:761）、ラウス肉種ウイルスの末端重複配列（LTR）由来のエンハンサー／プロモーター（Gormanら（1982）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777）、およびヒトまたはマウスCMV由来のエLEMENT（Boshartら、（1985）Cell 41:521）（例えば、CMVイントロンA配列に含まれるELEMENT）が挙げられる。

【0057】

別の実施例では、ペプチド模倣物をコードする配列（上記のように同定されそして調製される）は、ハイブリッド配列を得るために、ペプチドキャリア分子をコードする第2の配列と組み合わされる。多くの適切なペプチドキャリア配列は、当業者に公知であり、そしてこれらは全て、本発明を用いる使用に同等に適切である。しかし、好ましい実施例では、ペプチドキャリア分子は、B型肝炎ウイルスヌクレオカプシド抗原（HBcAg）をコードする配列により提供される。ペプチド模倣物をコードする配列は、HBcAgキャリア分子の免疫優性コアエピトープ（ICE）のループ領域中へ挿入され得る。あるいは、ICE領域が、この分子から消去され得、そしてペプチド模倣物をコードする配列が、ICE領域の位置に挿入され得るか、または分子のHBcAg部分の任意の他のN末端、C末端または内部位置へ挿入され得る。ハイブリッド分子のHBcAg部分へのペプチド模倣物をコードする配列の挿入が、ハイブリッドコアキャリア粒子へ自己組織化する発現産物の能力に影響しないことが好ましい。適切な宿主細胞にトランスフェクトする場合、組換え核酸分子は、ハイブリッドHBcAgキャリア部分をコードし、ここでHBcAg部分はキャリアとして機能し、そしてペプチド模倣物部分は、免疫原として機能する。

【0058】

組換え核酸分子のHBcAg部分が、既知のソースから得られ得る。これに関して、B型肝炎ウイルス（HBV）は、小さい、2本鎖DNAゲノムを有するエ

ンベローブウイルスである。HBVゲノムの配列（例えば、特にサブタイプの adw および ayw）は公知であり、そして十分に特徴化される（Tiollais ら（1985）Nature 317:489, Chisari ら（1989）Microb. Pathog. 6:311）。HBcAg は、180 個のアミノ酸残基から構成されるポリペプチドであり、そして非常に研究されたいくつかの免疫優性部分を有する（例えば、ICE ループ領域）。HBcAg は、HBcAg が粒子中に自己集合する、Escherichia coli および他の原核生物で容易に発現され得る。この理由として、多くのペプチド抗原が、HBcAg に融合されて、増強された B 細胞免疫原性を示すハイブリッドコアキャリア粒子を提供する（Schoedel ら（1994）J. Exper. Med. 180:1037; Clarke ら（1987）Nature 330:381; Borisova ら（1989）FEBS Lett. 259:121; Stahl ら（1989）Proc. natl. Acad. Sci. USA 86:6283）。HBcAg をコードする核酸配列もまた公知であり、そして HBcAg 配列を含むプラスミド構築物が記載されている（Schoedel ら（前出））。発現産物において、免疫優性ループ領域は、残基約 74～81 に存在する ICE と共に、180 残基の HBcAg 分子の残基 72～85 にわたる。

【0059】

いくつかの分子において、第3の、補助的配列が、哺乳動物細胞由来の付着ハイブリッドHBcAgペプチド模倣分子の分泌を提供する。このような分泌リーダー配列は、当業者に公知であり、そして例えば、組織プラスミノゲン賦活剤（tpa）リーダーシグナル配列を含む。

【0060】

一旦、ペプチド模倣物をコードする配列が、ハイブリッド配列を得るためにHBcAg配列中に挿入されると、この組換え分子は、挿入された配列に作動可能に連結されるコントロール配列を含むベクター中に挿入され得、従って、標的化された被験体種におけるインビボのハイブリッドHBcAg抗原分子の発現を可能にする。適切なコントロール配列が、本明細書中の上記に記載されている。

【0061】

一旦完了すると、上記の組換え核酸分子のいずれかが、標準的な遺伝子送達プロトコルを使用して、核酸免疫のために使用され得る。遺伝子送達の方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号、同第5,589,466号を参照のこと。遺伝子は、直接被験体に送達され得るか、あるいはエキソビボで被験体由来の細胞中へ送達され得、そしてその細胞が被験体に再移植され得る。

【0062】

例えば、アジュバント組成物の添加の有無で、上記の組換えポリヌクレオチドを含む調製物は、標準的な薬学的処方化学および方法論（その全てが当業者に容易に利用可能である）を用いて、提供され得る。例えば、1つ以上の核酸配列を含む組成物（例えば、DNAプラスミドのような適切なベクターの形態で存在）が、1つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤またはビヒクルと組み合わせられ、液体調製物を提供し得る。

【0063】

補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH干渉物質など）が、賦形剤またはビヒクル中に存在し得る。これらの賦形剤、ビヒクルおよび補助物質は、一般的に、この組成物を受容する個体の免疫応答を誘導せず、そして過度な毒性なく投与され得る薬学的因子である。薬学的に受容可能な賦形剤としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、水、生理的食塩水、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、グリセロールおよびエタノール。薬学的に受容可能な塩がまた、そこに含まれ得る：鉱酸塩（例えば、塩酸塩、臭化水素塩、リン酸塩、硫酸塩など）；および有機酸の塩（例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸の塩、安息香酸塩など）。必要とされないが、ペプチド、タンパク質または他の分子がワクチン組成物に含まれるべき場合、調製物は、特にそれらに対する安定剤として働く薬学的に受容可能な賦形剤を含むこともまた好まれる。ペプチドに対する安定剤としてもまた作用する適切なキャリアの例としては、これらに限定されないが、以下の薬学的グレードが挙げられる：ブドウ糖、ショ糖、乳糖、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストランなど。他の適切なキャリアとしては、以下が挙げられるが、再度これらには限定され

ない：デンプン、セルロース、リン酸ナトリウムまたはリン酸カルシウム、クエン酸、酒石酸、グリシン、高分子量のポリエチレングリコール（PEG）、およびその組み合わせ。薬学的に受容可能な賦形剤、ビヒクルおよび補助物質が、本明細書中で参考として援用される、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991) において利用可能である。

【0064】

核酸の取り込みおよび／または発現の促進剤 (facilitator) (「トランスフェクション促進因子」) もまた、組成物中に含まれ得る (例えば、促進剤 (例えば、ブピバカイン、心臓毒素 (cardiotoxin) およびスクロース) およびトランスフェクション促進化ビヒクル (例えば、核酸分子を送達するのに慣例的に使用されるリポソーム調製物)。有用なリポソーム調製物としては、カチオン性調製物 (正に荷電)、アニオン性調製物 (負に荷電) および中性調製物が挙げられ、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、プラスミドDNAの細胞内送達 (Felgnerら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416) および mRNA の細胞内送達 (Malloneら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6077-6081) を媒介することが示されている。

あるいは、本発明の核酸分子は、カプセル化され得るか、粒子状キャリアに吸着され得るか、または結合され得る。適切な粒子状キャリアは、ポリ (ラクチド)、およびポリ (ラクチド-co-グリコリド) に由来するPLG微粒子と同様に、ポリメチルメタクリレートポリマーに由来する粒子状キャリアを含む。例えば、Jefferyら (1993) Pharm. Res. 10:362-368 を参照のこと。他の粒子系およびポリマーもまた使用され得る (例えば、ポリマー：例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジン、ならびにこれらの分子の結合体)。

【0065】

所望の場合、ウイルスベクターは、本発明のポリヌクレオチドを送達するため

に使用され得る。多くのウイルスに基づく系は、哺乳動物細胞中への遺伝子輸送のために開発された。例えば、選択されたコード配列が、当該分野で公知の技術を使用して、ベクター中に挿入され得、そしてレトロウイルス粒子にパッケージされ得る。次いで、組換えウイルスが単離され得、そしてインビボまたはエキソビボのいずれかで被験体の細胞に送達され得る。多くのレトロウイルス系が、記載されている（米国特許第5, 219, 740号；Millerら（1989）*BioTechniques* 7:980-990；Miller, A. D. （1990）*Human Gene Therapy* 1:5-14；およびBurnsら（1993）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037）。

【0066】

多くのアデノウイルスベクターもまた記載される（Haj-Ahmadら（1986）*J. Virol.* 57:267-274；Bettら（1993）*J. Virol.* 67:5911-5921；Mitterederら（1994）*Human Gene Therapy* 5:717-729；およびRichら（1993）*Human Gene Therapy* 4:461-476）。さらに、種々のアデノ関連ウイルス（AAV）ベクター系が、遺伝子送達のために開発された。AAVベクターは、当該分野で周知の技術を用いて、容易に構築され得る。例えば、米国特許第5, 173, 414号および同第5, 139, 941号；国際公開番号WO 92/01070（1992年1月23日に公開された）およびWO 93/03769（1993年3月4日公開された）；Lebkowskiら（1988）*Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996；Vincentら（1990）*Vaccines* 90（Cold

Spring Harbor Laboratory Press）；Carter, B. J. （1992）*Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539；Muzyczka, N. （1992）*Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129；およびKotin, R. M. （1994）

Human Gene Therapy 5:793-801を参照のこと。本願ペプチド模倣物をコードする核酸分子を送達するための使用を見出すさらなるウイルスベクターとしては、ウイルスのポックスファミリー（ワクシニアウイルスおよび鳥類ポックスウイルスを含む）に由来する模倣物を含む。

【0067】

ここで再び、上記の核酸分子を含む、リポソームベクター組成物またはウイルスベクター組成物の処方が、標準的な薬学的処方化学および方法論（その全てが当業者に容易に利用可能である）を使用して、実施され得る。例えば、1つ以上の核酸分子を含む組成物が、1つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤またはビヒクルと組み合わせられ得る。補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝化物質など）が、賦形剤またはビヒクル中に存在し得る。

【0068】

必要とされないが、本発明のポリヌクレオチド医薬が、任意の適切なアジュバントまたはアジュバントと組み合わせて、有効に使用され得る。例えば、適切なアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アルミニウム塩（ミョウバン）から形成されるアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど）；水中油および油中水の乳剤処方物（例えば、完全フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA））；細菌性細胞壁成分から形成されたアジュバント（例えば、リポ多糖類を含むアジュバント（例えば、脂質A、またはモノホスホリル（monophosphoryl）脂質A（MPL）（Imotoら（1985）Tet. Lett. 26:1545-1548））、トレハロースジミコレート（trehalose dimycolate（TDM））および細胞壁骨格（CWS））；熱ショック蛋白またはその誘導体；以下に由来するアジュバント：ADPリボシル化（ADP-ribosylating）細菌性毒素（ジフテリア毒素（DT）、百日咳毒素（PT）、コレラ毒素（CT）、E. coli 非耐熱性毒素（LT1およびLT2）、Pseudomonas 内毒素A、Pseudomonas 体外毒素S、B. cereus 細胞外酵素、B. sphaericus 毒素、C. botulinum C2およびC3毒素、C. limo

sum細胞外酵素、ならびに*C. perfringens*、*C. spiriforma*および*C. difficile*、*Staphylococcus aureus* EDINに由来する毒素を含む)、およびADP-リボシル化細菌性毒素変異体(例えば、CRM₁₉₇、非毒性ジフテリア毒素変異体)(例えば、Bixlerら(1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:175; およびConstantinoら(1992) *Vaccine*) ; サポニンアジュバント(例えば、Quil A (米国特許第5,057,540号)、またはISCOM (免疫刺激複合体) のようなサポニンから生成される粒子; ケモカインおよびサイトカイン(例えば、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12など)、インターフェロン(例えば、ガマインターフェロン(*gamma interferon*))、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)、ディフェンシン1または2、RANTES、MIP1- α およびMIP-2など); ムラミル(*muramyl*) ペプチド(例えば、N-アセチル- μ ラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(*thr-MDP*)、N-アセチル- ν ラミル(*normuramyl*) -^L-アラニル-^D-イソグルタミン(*nor-MDP*)、N-アセチル- μ ラミル-^L-アラニル-^D-イソグルタミン-^L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル(*dipalmitoyl*))-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ(*hydroxyphosphoryloxy*))-エチルアミン(MTP-PE) など; 分子のCpGファミリー、CpGジヌクレオチドおよびCpGモチーフを含む合成オリゴヌクレオチドに由来するアジュバント(例えば、Kriegら、*Nature* (1995) 374:546, Medzhitovら(1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9:4-9、およびDavisら、*J. Immunol.* (1998) 160:870-876を参照のこと); および合成アジュバント(例えば、PCPP (ポリ [ジ (カルボキシルアトフェノキシ (*carboxylatophenoxy*)) ホスファゼン (*phosphazene*)) (Payneら、*Vaccines* (1998) 16:92-98)。このようなアジュバントは、多くの業者(例えば、Accurate Chemicals; R

i b i Immune chemicals, Hamilton, MT; GIBCO; Sigma, St. Louis, MO) から市販される。好ましいアジュバントは、ADPリボシル化細菌性毒素に由来するアジュバントであり、コレラ毒素および熱不安定性毒素が最も好ましい。CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドもまた、好まれる。他の好ましいアジュバントは、核酸形態（例えば、ケモカインおよびサイトカインをコードする核酸配列）において提供されるアジュバントである（例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12など）、インターフェロン（例えば、ガマインターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）、ディフェンシン1または2、RANTES、MIP1- α 分子およびMIP-2分子）。

【0069】

アジュバントは、個々に送達され得るか、または2つ以上のアジュバントの組み合わせで投与され得る。これに関して、組み合わされたアジュバントは、所望の免疫応答を促進することにおける相加効果または相乗効果を有し得る。相乗効果は、2つ以上のアジュバントを組み合わせることにより達成される結果が、個々に投与される場合に各アジュバントを用いて達成される結果をただ足すことによって期待する効果より大きい効果である。好ましいアジュバントの組み合わせは、ADP-リボシル化細菌性毒素およびCpGモチーフを含む合成オリゴヌクレオチドに由来するアジュバントである。

【0070】

核酸免疫化において使用される場合に、処方された組成物は、ある量の核酸分子を含み、この核酸分子は、免疫された被験体において発現されてペプチド模倣物を提供する場合に、上で規定されるように、免疫応答を増加させるに十分である。適切な効果的な量は、当業者により容易に決定され得る。このような量は、慣用的な試行を通して決定され得る比較的広い範囲に入る。この組成物は、約0.1%～約99.9%の組換え核酸分子を含み得、そして当業者に公知の方法を使用して、被験体に直接投与され得るか、または被験体由来の細胞にエキソビボで送達され得る。

【0071】

例えば、本発明のポリヌクレオチド医薬品は、種々の公知の経路および技術を使用して、被験体にインビボで投与され得る。液体調製物は、注射可能な液剤、懸濁剤またはエマルジョンとして提供され得、そして従来の針およびシリンジを使用するか、または液体ジェット注射システムを使用して、非経口、皮下、皮内、筋内、静脈内の注射を介して投与され得る。液体調製物はまた、皮膚または粘膜組織に局所的に投与され得るか、あるいは呼吸または肺投与に適した細分割されたスプレーとして提供され得る。他の投与方法としては、経口経路、坐剤、および能動的または受動的な経皮送達技術が挙げられる。

【0072】

あるいは、ワクチン組成物は、エキソビボで投与され得、例えば、被験体への形質転換細胞の送達および再移植は、公知である（例えば、デキストランにより媒介される形質転換、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、および核への直接のマイクロインジェクション）。他の投与経路としては、直腸および鞘、腹腔内、静脈内、経口および筋内が挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

しかし、核酸分子が無針シリンジを使用して送達される（例えば、核酸をコーティングした微粒子を標的組織に噴出する、粒子加速デバイス）か、または粒子状の核酸組成物を経皮的に送達することが、好ましい。これに関して、遺伝子銃に基づく核酸免疫化は、ナノグラムの量のDNAの表皮送達に続いて、体液および細胞毒性の両方のTリンパ球免疫応答を惹起することが示された。P e r t m e r ら（1995）V a c c i n e 13:1427-1430。粒子により媒介される送達技術は、他の型の核酸接種と比較され、そして顕著に優れていることが見出された。F y n a n ら（1995）I n t . J . I m m u n o p h a r m a c o l o g y 17:79-83、F y n a n ら（1993）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90:11478-11482、およびR a z ら（1994）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 91:9519-9523。このような研究は、核酸に基づくワクチンの、表面の皮膚および筋肉組織の両方への、粒子により媒介される送達を調査した。

【0074】

核酸調製物を送達するための、粒子により媒介される方法は、当該分野において公知である。従って、一旦、調製および適切に精製されると、上記核酸分子は、当該分野において公知の種々の技術を使用して、コアキャリア粒子にコーティングされ得る。コアキャリア粒子は、遺伝子銃デバイスからの細胞内送達のために代表的に使用される粒子サイズの範囲内の適切な密度を有する材料から、選択される。最適なキャリア粒子サイズは、もちろん、標的細胞の直径に依存する。

【0075】

本発明の目的で、タングステン、金、白金およびイリジウムのキャリア粒子が、使用され得る。タングステンおよび金の粒子が好ましい。タングステン粒子は、 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$ の直径の平均サイズで、容易に入手可能である。金粒子または微晶質金（例えば、金粉末A1570（Engelhard Corp.、East Newark、NJから入手可能））もまた、本発明に用途を見出す。金粒子は、均一な大きさを提供する（Alpha Chemicalsから $1 \sim 3 \mu\text{m}$ の粒子サイズで入手可能、またはDegussa、South Plainfield、NJから $0.95 \mu\text{m}$ を含む粒子サイズの範囲で入手可能）。微晶質金は、様々な粒子サイズ分布を提供し、代表的に、 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ の範囲である。しかし、微晶質金の不規則な表面積は、核酸での非常に効率的なコーティングを提供する。

【0076】

DNAまたはRNAを金またはタングステンの粒子上にコーティングまたは沈殿させるための、多数の方法が公知であり、そして記載されてきた。このような方法の大部分は、一般に、所定の量の金またはタングステンを、プラスミドDNA、 CaCl_2 およびスペルミジンと組み合わせる。得られる溶液を、コーティング手順の間連続的にボルテックスして、反応混合物の均一性を確実にする。核酸の沈殿後、コーティングされた粒子は適切な膜に移されて使用前に乾燥され得るか、サンプルモジュールまたはカセットの表面にコーティングされ得るか、あるいは特定の遺伝子銃器具において使用するための送達カセットに装填され得る。

【0077】

粒子により媒介される送達に適した種々の無針シリンジは、当該分野において公知であり、そして本発明の実施における使用に全て適する。現在のデバイス設計は、爆発的放出、電氣的放出または気体による放出を使用して、コーティングされたキャリア粒子を標的細胞へと推進する。コーティングされたキャリア粒子は、それら自体が移動可能なキャリアシートに解放可能に付着し得るか、または気体流が通過する表面に除去可能に付着され得、粒子をこの表面から持ち上げてこれらを標的へと加速する。気体による放出デバイスの例は、米国特許第5,204,253号に記載されている。爆発型のデバイスは、米国特許第4,945,050号に記載されている。ヘリウム放出型の粒子加速装置の1つの例は、PowderJECT XR（登録商標）器具（PowderJECT Vaccines, Inc.、Madison）、WIであり、この器具は、米国特許第5,120,657号に記載されている。本明細書中における使用に適した電気放出装置は、米国特許第5,149,655号に記載されている。これら全ての特許の開示は、本明細書中に参考として援用される。

【0078】

あるいは、粒子状の核酸組成物は、従来の無針シリンジデバイスを使用して、経皮的に投与され得る。例えば、本発明の核酸分子を含む粒子組成物は、単純なエバポレーション（結晶化）、減圧乾燥、スプレー乾燥または凍結乾燥のような、一般的な薬学的方法を使用して、得られ得る。所望であれば、共有にかかる国際公開公報第WO97/48485号（本明細書中に参考として援用される）に記載される技術を使用して、粒子はさらに濃厚化され得る。次いで、これらの粒子性組成物は、共有にかかる国際公開公報第WO94/24263号、同第WO96/04947号、同第WO96/12513号、および同第WO96/20022号（これらは全て、本明細書中に参考として援用される）に記載されるもののような無針シリンジシステムから送達され得る。

【0079】

上で参照した無針シリンジシステムからの粒子の送達は、概して0.1～250 μm の範囲、好ましくは約10～70 μm の範囲のおおよそのサイズを有する

粒子を用いて実施される。約 $250\mu\text{m}$ より大きな粒子もまた、このデバイスから送達され得、ここで上限は、粒子のサイズが皮膚細胞への不都合な損傷を引き起こす点である。送達される粒子が標的表面を貫通する実際の距離は、粒子サイズ（例えば、丸い球状の粒子構造を仮定した、見かけ上の粒子直径）、粒子密度、粒子が表面に衝突する初速度、ならびに標的皮膚組織の密度および運動粘性率に依存する。これに関して、無針注射において使用するための最適な粒子密度は、概して約 $0.1\text{g}/\text{cm}^3$ と約 $25\text{g}/\text{cm}^3$ との間、好ましくは約 $0.9\text{g}/\text{cm}^3$ と $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ との間の範囲であり、そして注射速度は、概して約 $100\text{m}/\text{秒}$ と $3,000\text{m}/\text{秒}$ との間の範囲である。適切な気体圧を用いて、 $10\sim 70\mu\text{m}$ の平均直径を有する粒子は、駆動気流の超音速に近付く速度で、ノズルを通して加速され得る。

【0080】

本発明のなお別の実施形態において、被験体において免疫応答を惹起するための方法が提供される。この方法は、被験体の細胞を、（本明細書中で上記のような）本発明の組換え核酸分子の1つで、少なくとも第1工程（これは、被験体において、標的抗原に対する免疫応答を惹起するに適切なレベルで、ペプチド模倣物の発現を引き起こすに十分である）で形質転換する工程を包含する。この方法は、ブーストする工程において、被験体に二次的に投与する工程を包含し得、ここで、第二の投与において送達されるワクチン組成物は、同じ核酸分子であり得るか、または同じペプチド模倣物を含む異なる分子であり得る。例えば、二次的な組成物は、ペプチド模倣物をコードする核酸分子を含む任意の適切なワクチン組成物、または既にペプチドもしくはタンパク質の形態であるペプチド模倣物を含む組成物であり得る。二次的な組成物のインピボでの直接的な送達は、一般に、上記のようにウイルスベクター（例えば、改変されたワクシニアベクター）を用いてかまたは用いずに、従来のシリンジを使用するかまたはこれもまた上記のような粒子により媒介される送達システムを使用するかのいずれかで注射することにより、達成される。注射は、代表的に、皮下、表皮、皮内、粘膜内（例えば、鼻腔、直腸および／または膣）、腹腔内、静脈内、経口または筋内のいずれかである。他の投与方法としては、経口および肺投与、坐剤、および経皮適用が挙

げられる。投薬量処置は、単回用量計画であっても、複数用量計画であってもよい。

【0081】

(C. 実施例)

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の実施例である。これらの実施例は、例示の目的のみで与えられ、そしていかなる様式においても本発明の範囲を限定することは意図されない。

【0082】

使用した数（例えば、量、温度など）に関する正確さを確実にすることを努力したが、いくつかの実験誤差および偏差が、もちろん、考慮されるべきである。

【0083】

(実施例1)

(ハイブリッドHBcAg抗原分子の構築)

C末端のアルギニンリッチな領域が除去された、HBcAg粒子をコードする配列を得た（この欠失は、粒子形成を妨害しない）。次いで、独自の制限部位（BSP120I部位）をICEに挿入して、1つ以上のペプチド模倣配列のための挿入点を提供した。得られた配列を、以下に配列番号4として示す。ここで、BSP120I部位を、枠で囲んだ配列領域により示す。

【0084】

【化1】

ATG GAC ATT GAC CCT TAT AAA GAA TTT GGA GCT ACT GTG GAG
 TTA CTC TCG TTT TTG CCT TCT GAC TTC TTT CCT TCC GTC AGA
 GAT CTC CTA GAC ACC GCC TCA GCT CTG TAT CGG GAA GCC TTA
 GAG TCT CCT GAG CAT TGC TCA CCT CAC CAC ACC GCA CTC AGG
 CAA GCC ATT CTC TGC TGG GGG GAA TTG ATG ACT CTA GCT ACC
 TGG GTG GGT AAT AAT TTG GAA GAT CCA GCA GGG CCC CGG GAT
 CTA GTA GTC AAT TAT GTT AAT ACT AAC ATG GGT TTA AAA ATT
 AGG CAA CTA TTG TGG TTT CAT ATA TCT TGC CTT ACT TTC GGA
 AGA GAG ACT GTA CTT GAA TAT TTG GTA TCT TTC GGA GTG TGG
 ATT CGC ACT CCT CCA GCC TAT AGA CCA CCA AAT GCC CCT ATC
 TTA TCA ACA CTT CCG GCG CGG CCG CTC TAA

(配列番号4)

配列番号4の組換え核酸分子から転写されるタンパク質を、以下に配列番号5として示す。ここで再度、ペプチド模倣配列のための挿入点(BSP120I部位)を、枠で囲んだ残基により示す。

【0085】

【化2】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP
 HHTALRQAIL CWGELMTLAT WVGNNLEDPA GPRDLVVNYV NTNMGLKIRQ
 LLWFHISCLT FGRETVLEYL VSFGVWIRTP PAYRPPNAPI LSTLPARPL

(配列番号5)

次いで、分泌シグナルペプチドのコード配列を含む配列を、キャリアペプチド配列に連結して、組換え核酸分子を提供した。この特有の分泌配列は、組織プラスミノゲンアクチベーター(tpa)シグナルペプチドのコード配列であり、そして配列番号6として以下に示される。

【0086】

【化3】

ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG
TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG GCT

(配列番号6)

このtpaシグナルペプチドのタンパク質配列を、配列番号7として以下に示す。

【0087】

【化4】

MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SA

(配列番号7)

次いで、この得られた組換え分子を、初期CMVプロモーターおよびイントロンA領域を含むプラスミド骨格に挿入して、発現カセットを得た。得られた構築物を、p7198と呼び、そしてこの構築物の地図を、図1に示す。

【0088】

次いで、髄膜炎菌C群ポリサッカリド抗原のペプチド模倣物をコードする合成オリゴヌクレオチドを提供した。これらのオリゴヌクレオチドによりコードされるペプチド模倣物の配列は、以下である：

【0089】

【化5】

ACARIYYRYDGFAY

(配列番号1)

この合成オリゴヌクレオチドの核酸配列を、配列番号2および配列番号3として以下に示す。

【0090】

【化6】

GGCCTGCTTGTGCTAGAATCTATTACAGATATGATGGATTTCGCTTACG

(配列番号2)

GGCCCGTAAGCGAATCCATCATATCTGTAATAGATTCTAGCACAAGCA

(配列番号3)

配列番号2または配列番号3のオリゴヌクレオチドを、図1に示されるようにp7198中のB型肝炎コア抗原ペプチドキャリア配列のBSP120I制限部位にクローニングした。このキャリアプラスミドへのペプチド模倣DNAの首尾のよいクローニングを、製造業者の使用説明書に従い市販のHB_e(rDNA)EIAキット(Abbott Laboratories)を使用して決定されるように、トランスフェクトされたB16細胞におけるB型肝炎コアのDNA配列決定および適切な発現によって確認した。

【0091】

(プライマーアニーリングおよびクローニング)より詳細には、2 μ Lのオリゴ対を、18 μ Lの50mM NaCl、10mM Tris-Cl(pH7.9)緩衝液に添加して、そして65℃で2分間インキュベートした。この対を、65℃の水で満たされた100mLビーカーに移して、これを、ベンチトップ(benchtop)上で室温まで冷却した。

【0092】

このペプチドキャリアプラスミドを、制限酵素(BSP120I)で切断して、続いてエピアルカリホスファターゼで5'ホスフェートを除去して、そして低融点アガロースで電気泳動した。プラスミドを含むゲルスライスを単離して、そして65℃で10分間加熱して、このゲルスライスを融解した。2 μ Lの融解アガロースを除去し、そして28 μ Lの1×リガーゼ緩衝液に添加した。この混合液に、1 μ Lのアニーリングしたオリゴ対および0.5 μ L T4 DNAリガーゼを添加した。16℃での一晩のインキュベーションの後に、この連結反応物を、コンピテント細胞に形質転換し、アンピシリンを含むLBプレート上にプ

レートし、そして一晩インキュベートして耐性コロニーを増殖させた。プラスミドDNAを耐性コロニーから単離して、そして標準的な方法によって挿入されたオリゴの存在についてスクリーニングした。オリゴの存在について陽性のプラスミドDNAを配列決定して、オリゴ挿入の忠実度を確認した。予期された配列を有することが決定されたプラスミドを、B16細胞およびHBe (rDNA) EIAキット (Abbott Laboratories) を利用して、インビトロ「e」抗原 (コア抗原の形態) 遺伝子発現についてさらに分析した。

【0093】

(遺伝子発現のインビトロ分析) 一日目に、宿主細胞を、20～40%コンフルエンスにて組織培養プレート上にプレートし、そしてインキュベーター中で一晩増殖させた。2日目に、トランスフェクション反応を行った。試験される各ベクターについて、20 μ LのLipofectin (登録商標) 試薬 (Life Technologies) を、180 μ LのOptimen (登録商標) 培地 (Life Technologies) に添加して、そして室温で45分間インキュベートした。試験される各ベクターについて、2 μ gのベクターを、使用直前に200 μ LのOptimem (登録商標) 培地に混合した。45分で、このベクターおよびLipofectin (登録商標) 溶液を、一緒に混合して、そして室温でさらに10分間静置した。この最後のインキュベーションの間に、プレートした宿主細胞を、インキュベーターから取り出し、そしてOptimem (登録商標) 培地で2回洗浄した。10分で、1.6 mlのOptimem (登録商標) を、Lipofectin (登録商標) /ベクター混液に添加して、そして1 mlの得られた混液を、Optimem (登録商標) 洗浄液が除去された2つの細胞ウェルの各々に添加した。組織培養プレートを、インキュベーターに戻して、そして5時間、静かな状態に置き、その時点でLipofectin (登録商標) /ベクター混液を除去して、そして標準的な細胞維持培地と交換した。

【0094】

培地の交換の18時間から24時間後に、細胞維持培地を回収して、細胞ウをPBSで洗浄して、そして500 μ LのPBS / 0.1% Triton X1

00を添加することによって溶解した。この培地および細胞溶解物を遠心分離して、小片を除去して、そして50～100 μ LのこれらのサンプルをHbe (rDNA) EIAキット (Abbott Laboratories) に提供された反応容器のウェル中に置くことによって、このサンプルを、抗原発現について分析した。試験サンプルの容量を、PBSで調整して、そしてこの手順を、製造業者の使用説明書に従って継続した。インキュベーションが終了したときに、このウェルを洗浄して全ての液体反応成分を除去して、そして各ウェルに、300 μ Lの発色緩衝液を添加した。30分で、1モル濃度の硫酸を添加することによって、発色反応を停止して、そして反応物の吸光度を、490 nmで測定した。この吸光度のデータは、産生される抗原の量および抗原が細胞の外側に分泌される能力と相関する。

【0095】

(実施例2)

(髄膜炎菌ポリサッカリド抗原のペプチド模倣物をコードする核酸分子を用いる免疫)

7週齢の雌性Balb/Cマウスを、免疫原性研究について使用した。ワクチン接種のためにマウスを調製するために、10mg/kgキシラジンと混合した100mg/kgケタミンを腹腔内注射することによって、マウスを麻酔して、そして腹部の皮膚を、クリッピングによって剃毛した。第1の研究において、以前に記載されるようにPowderject XR遺伝子銃デバイス (Powderject Vaccines, Inc., Madison, Wisconsin) を使用して、1 μ gのMP-MCP DNAにより、0日目、21日目および50日目に、マウス (n=6) にワクチン接種した。Yangら (1997) 「Particle-Mediated Gene Delivery in vivo and in vitro」, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, Inc. 12.6.1-12.6.14。6匹のコントロールマウスを、ペプチド模倣物インサートを含まないB型肝炎コア抗原をコードするコントロールベクターでワクチン接種した。全てのマウスを、80日目に、5 μ gの髄膜炎菌

C群ポリサッカリド (MCP) によりIPでブーストした。各ワクチン接種の前に、MCPブーストの7日後および14日後に、血液サンプルを、麻酔下で眼窩採血により回収した。

【0096】

DNAワクチン接種後の抗体応答を、公開された技術に従い、検出抗原としてMCPを使用するELISAによって決定した。Granoffら(1998) Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5 (4) 479~485。DNAワクチン単独によるワクチン接種は、検出可能なIgG抗体を誘発しなかった。全てのマウスは、MCPブーストに対してブーストの一週間後に、高いIgG力価で応答し、そしてこの力価を、変化することなく2週間維持した。このことにより、DNAワクチン接種の適切な開始が示唆される。B型肝炎コア抗原のみをコードするコントロールベクターでプライムされ、次いでMCPでブーストされたコントロールマウスは、試験した任意の時点で、実質的にIgG力価を有さなかった(図2を参照のこと)。

【0097】

髄膜炎菌に対する殺菌性抗体は、保護と相関することから、公開された技術を使用して、マウス血清の殺菌血清を決定することが理解される。Maslankaraら(1997) Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4 (2) 156~167。免疫前血清およびDNAワクチン接種後血清では、検出可能な殺菌性力価は、存在しなかった。しかし、MCPブースト後に、DNAで免疫したマウスおよびコントロールベクターで免疫したマウスの両方において、殺菌性力価を検出したが、MP-MCP DNAでプライムされ、かつMCPでブーストされた動物は、MCPでブーストもされたコントロール群よりも高力価であった(以下の表1を参照のこと)。

【0098】

【表1】

表1：殺菌性抗体応答について、MP-MCP DNA
ワクチン接種でプライムされたマウス

群	プライム	ブースト	殺菌性力価
1	MP-MCP DNA	MCP	64
2	ベクター	-	<8
3	ナイーブ	MCP	8

注記：

1. MP-MCP DNAによる初回免疫を、0日目、21日目および50日目に与え、そしてMCPによるブースト免疫を、80日目に行った。血液サンプルを、87日目に採取した。6匹のマウスからプールされた血清をアッセイした。
2. 殺菌性力価は、このアッセイに含まれる細菌のうち50%を殺滅した最高の血清希釈である。

第2の免疫研究を行って、MP-MCP DNAを使用する2つのワクチン接種がIgG応答をマウスでプライムするに十分であるか否かを決定した。この第2の研究では、マウスを、Powder Jet XR デバイスを使用して、0日目および28日目に、1 μ g のMP-MCP DNAによりワクチン接種して、そして40日目に、5 μ g のMCP ポリサッカリドを用いてIP注射によりブーストした。血液サンプルを、0日目、40日目および47日目に回収した。DNA ワクチンでプライムされ、次いでMCP でブーストされたマウスは、コントロールベクターでプライムされ、かつMCP でブーストされたコントロールマウスよりも有意に高い力価を有した（図3を参照のこと）。このことは、1 μ g のDNAによる2つの免疫がIgG応答をマウスでプライムするに十分であったことを示した。

【0099】

従って、新規な組換え核酸分子、これらの分子を含む組成物、およびこれらを使用する方法が、記載されている。本発明の好ましい実施形態が、いくらか詳細に記載されているが、自明な変更が、添付の特許請求の範囲により規定されるような本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、標的抗原のペプチド模倣物を発現するDNAベクターを示す。このベ

クターは、CMVプロモーターの制御下で、B型肝炎コア抗原キャリアペプチドを発現する。このペプチド模倣物をコードするDNAが、このコア抗原配列の内部部分にクローン化される。コア抗原および模倣物ペプチドを含むキメラ分子は、このベクターから発現される。

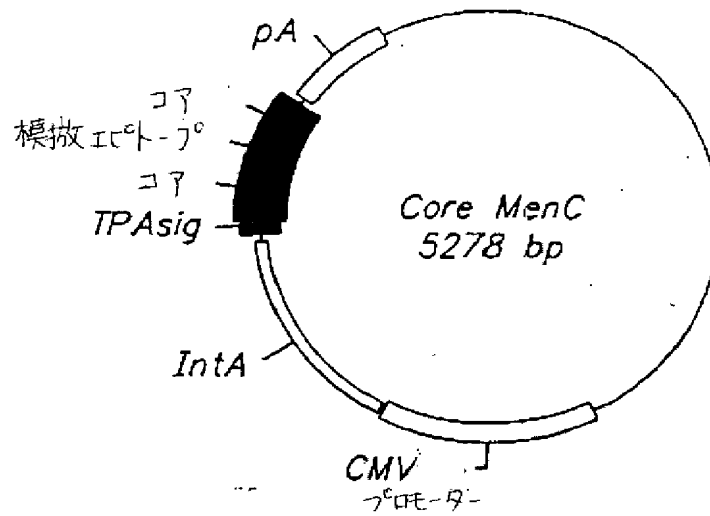
【図2】

図2は、実施例2の第1の免疫研究からの結果を示す。IgG力価は、ペプチド模倣物MCP DNAワクチンで免疫し、そして髄膜炎菌グループCポリサッカリド(MCP)でブーストしたマウスにおける、MCPに対するものである。マウスを、0日目、21日目および50日目に、1 μ gのDNAワクチンでワクチン接種した。コントロールマウスは、同じスケジュールで、B型肝炎コア抗原ペプチドキャリアのみをコードするベクターでワクチン接種した。全てのマウスを、80日目に5 μ gのMCPでブーストした。MCPに対するIgG力価を、6匹のマウスからプールした血清を使用して決定した。血清を、1:20、1:40、1:80および1:160希釈で試験した。データは、1:20の血清希釈度で検出されたMCPに対する抗体力価を示す。

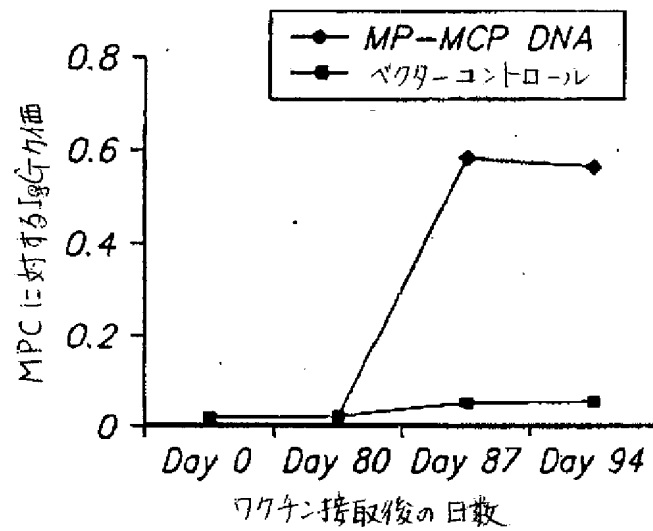
【図3】

図3は、実施例2の第2の免疫研究からの結果を示す。IgG力価は、ペプチド模倣物DNAワクチン(MCP標的抗原に対応する)で免疫したマウスにおける、MCPに対するものである。マウスを、0日目および28日目に、1 μ gのDNAワクチンでワクチン接種し、次いで、60日目に、5 μ gのMCPでブーストした。コントロールマウスは、60日目に、5 μ gのMCPを受けた。MCPに対するIgG力価を、4匹のマウスからプールした血清を使用して決定した。血清を、1:20、1:40、1:80および1:160希釈で試験した。このMCPに対するIgG力価は、最大のELISA読取り値の25%を与える、血清希釈度でのものである。

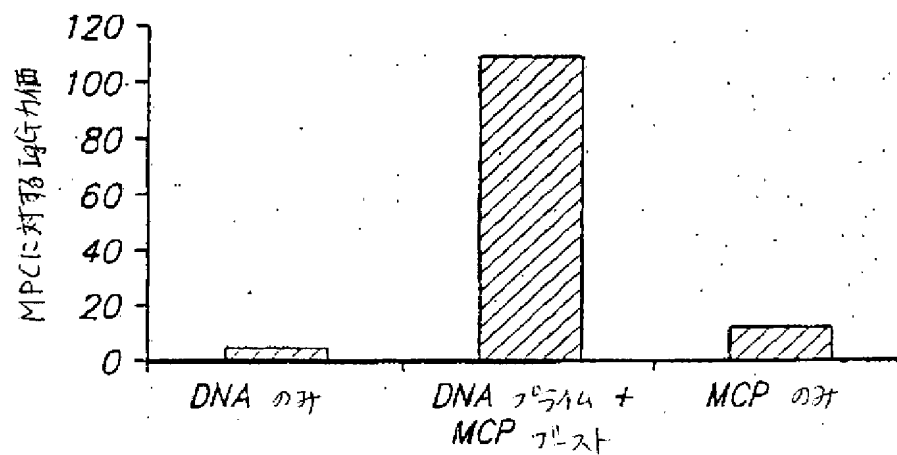
【図1】



【図2】



【図3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/10766		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C12N15/85 C12N15/88 A61K39/02 A61K39/09 A61K39/095 A61K39/102		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 11605 A (DANA FARBER CANCER INST INC ;UNIV PITTSBURGH (US)) 3 April 1997 (1997-04-03)	1-3, 13-17, 39-46, 49-54
Y	page 5 -page 7, line 12 page 9, line 4 - line 9 examples	47,48
Y	US 5 865 796 A (MCCABE DENNIS E) 2 February 1999 (1999-02-02) column 2, line 17 - line 29 example	47,48
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 October 2000		Date of mailing of the international search report 06/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx: 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ceder, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/US 00/10766

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5 766 878 A (WALLIS NICOLA GAIL) 16 June 1998 (1998-06-16) column 3, line 14 - line 17 column 21, line 23 - line 38 column 21, line 51 - line 65	1,2,4, 13,49, 51-54 6,18,19, 21,23, 30,50
X A	WO 94 27435 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 8 December 1994 (1994-12-08) page 10, line 1 - line 21 page 15, line 1 - line 4 page 19, line 10 - line 29 page 22, line 11 - line 16	1-4,12, 49,51-53 28
X Y	WO 98 22145 A (SINAI SCHOOL MEDICINE ;BONA CONSTANTIN (US); BOT ADRIAN (US)) 28 May 1998 (1998-05-28) page 3, line 13 -page 4, line 13; claims	1-6, 12-23, 29-38, 49-52,54 1,5,6,8, 18,22, 23,25
Y	WESTERINK ET AL.: "Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide" PROC NATL ACAD SCI USA, vol. 92, April 1995 (1995-04), pages 4021-4025, XP002150633 cited in the application abstract	1,5,6,8, 18,22, 23,25
A	MILICH D R ET AL: "THE HEPATITIS NUCLEOCAPSID AS A VACCINE CARRIER MOIETY" ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK, NY, US, vol. 754, 31 May 1995 (1995-05-31), pages 187-201, XP000891480 ISSN: 0077-8923 the whole document	18-38,50
A	SCHOEDEL F ET AL: "IMMUNITY TO MALARIA ELICITED BY HYBRID HEPATITIS B VIRUS CORE PARTICLES CARRYING CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN EPITOPES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 180, no. 3, September 1994 (1994-09), pages 1037-1046, XP000891465 ISSN: 0022-1007 abstract	18-38,50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 51-54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/10766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9711605 A	03-04-1997	AU 716497 B	24-02-2000
		AU 7251596 A	17-04-1997
		BG 102355 A	30-04-1999
		CA 2233278 A	03-04-1997
		CN 1201369 A	09-12-1998
		CZ 9800929 A	16-09-1998
		EP 0863704 A	16-09-1998
		HU 9802651 A	01-02-1999
		JP 11512724 T	02-11-1999
		NO 981386 A	28-05-1998
		NZ 319891 A	28-01-1999
		PL 325953 A	17-08-1998
		SK 40198 A	04-11-1998
US 5865796 A	02-02-1999	US 5584807 A	17-12-1996
		AU 674815 B	09-01-1997
		AU 1729595 A	08-08-1995
		BR 9505691 A	16-01-1996
		CA 2158733 A	27-07-1995
		CN 1124460 A	12-06-1996
		EP 0690732 A	10-01-1996
		JP 8509131 T	01-10-1996
		NZ 279995 A	27-04-1998
		RU 2134295 C	10-08-1999
		WO 9519799 A	27-07-1995
US 5766878 A	16-06-1998	EP 0900229 A	10-03-1999
		US 5880262 A	09-03-1999
		WO 9741135 A	06-11-1997
WO 9427435 A	08-12-1994	EP 0702516 A	27-03-1996
		JP 9500013 T	07-01-1997
WO 9822145 A	28-05-1998	AU 7298498 A	10-06-1998
		EP 0946200 A	06-10-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	39/09	A 6 1 K	39/09
	39/095		39/095
	47/02		47/02
	48/00		48/00
A 6 1 P	31/04	A 6 1 P	31/04
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00
	Z N A		Z N A A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	4B024 AA01 BA31 CA02 DA02 HA17		
	4C076 AA19 AA32 AA61 BB16 CC06		
	CC31 DD21 FF68		
	4C084 AA02 AA13 BA44 CA04 CA53		
	CA62 MA05 MA24 MA38 MA41		
	MA66 NA14 ZB351 ZB352		
	4C085 AA03 BA14 BA16 CC01 CC08		
	CC32 EE01 EE05 GG04		
	4C087 AA02 BC83 MA66 NA14 ZB35		